

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ПРИМЕСНЫХ КОМПОНЕНТОВ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТАХ

Н.А. Ключев

Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н.Северцова РАН
117017, Москва, Ленинский проспект, 33

Обсуждаются принципиальные подходы к интерпретации и установлению структуры примесных компонентов (в количествах 0,01 - 3%) в промышленных фармацевтических препаратах. Для этой цели используют традиционные сочетания методов ГЖХ, ВЭЖХ с масс-спектрометрией, а для анализа труднолетучих и полимерных продуктов - метод масс-фрагментографии. Вид ионизации - электронный удар. Дается подход к интерпретации изомерных соединений (изомерно - специфический анализ) на примере терпеноидов.

Ключев Николай Алексеевич - заведующий лабораторией аналитической экотоксикологии Института проблем экологии и эволюции им. А.Н.Северцова. Российской академии наук, кандидат химических наук.
Область научных интересов: теоретическая органическая химия, молекулярная масс-спектрометрия, хромато-масс-спектрометрия, аналитические измерения в экологических исследованиях.
Автор более 450-ти публикаций в отечественных и международных изданиях и около 30-ти изобретений.

относительно комбинированного метода - хромато-масс-спектрометрии (ХМС), в котором в качестве хроматографического детектора используется масс-спектрометр. За рубежом указанный метод используется чрезвычайно широко как в медицине и в фармакологии [3,4], так и в токсикологии [5], когда идентификация соединений и предел их обнаружения определяется величиной $1 \cdot 10^{-9}$ - $1 \cdot 10^{-12}$ г/мл [5,6].

В настоящей статье рассмотрены методологические подходы к установлению структуры примесей в лекарственных препаратах, чистота которых согласно научно-технической документации или фармакопейным статьям, выше 95%. Таким образом, структурному исследованию подвергаются компоненты, количество которых в смесях составляет 0.01 - 3% от целевого продукта.

По своей природе примеси могут быть термически лабильными веществами (органические соли, пептиды, сахара и др.). Они часто плохо или практически нерастворимы в органических растворителях (пуриновые основания, полимеры и др.). Поэтому подходы к их обнаружению и идентификации могут варьироваться. Однако независимо от использованного методического приема необходимым условием корректной идентификации фармацевтического компонента является знание его масс-спектрометрических характеристик. В случае, когда таковые отсутствуют, то становится необходимым знание групповых масс-спектрометрических характеристик по определенному классу соединений (терпеноиды, липиды и т.д.), к которому принадлежит идентифицируемый компонент. Дополнительно перед этим этапом идентификации осуществляют исследование, направленное на поиск корреляцион-

Расширение ассортимента лекарственных средств и повышение их эффективности находится в прямой зависимости от уровня существующих в отрасли методов контроля их качества и стандартизации. В настоящий момент определение чистоты и стандартизация фармацевтических препаратов, проводимая на этапах государственного контроля, не отвечает современным требованиям как по уровню чувствительности, так и по возможностям структурной информации об имеющихся примесях в готовом фармакопейном продукте или в полупродуктах на стадиях его производства. Государственная фармакопея [1] не включает масс-спектрометрический анализ, обладающий наибольшей структурной информативностью и чувствительностью [2], в арсенал аналитических средств, применяемых в фармацевтическом анализе. Такое же положение сохраняется и

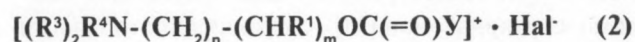
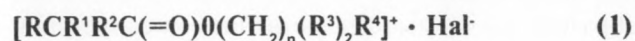
ных зависимостей между процессами диссоциативной ионизации и структурными особенностями загрязняющих компонентов, отнесенных к конкретному классу веществ. Последнее определяется технологией получения лекарственного препарата. Выбор условий ионизации для изучаемых веществ в смесях впоследствии будет продиктован именно их химической природой. При проведении эксперимента должна существовать гарантия, что первоначальная структура соединения не будет изменяться в условиях ионизации, т.е. не должны протекать внутримолекулярные перегруппировки с молекулярным ионом ($[M]^+$) и не должна происходить его изомеризация [7]. Аналогичные превращения с $[M]^+$ могут возникать в результате термических воздействий при введении анализируемой пробы через инжектор хроматографа.

Решив вопрос о структурных критериях, которыми можно пользоваться для установления строения примесей, можно перейти ко второй части аналитической задачи. Обычно для идентификации примесных продуктов используют метод хромато-масс-спектрометрии. ХМС обеспечивает необходимую чувствительность для летучих и стабильных лекарственных веществ. При анализе термолабильных или труднолетучих веществ, когда методы химической дериватизации не дают должного эффекта [8,9], используют сочетание методов препаративного выделения (с помощью ТСХ или ВЭЖХ) с последующей съемкой масс-спектров*. В случае, когда примесь нерастворима, используют метод масс-фрагментации в варианте CID или MID (селективное или многоионное детектирование) [10,11]. Количественную оценку производят, применяя внутренний стандарт, сопоставляя площади стандарта и определяемого компонента.

Ниже рассматриваются конкретные примеры идентификации примесных компонентов в ряде лекарственных препаратов в рамках установленной выше схемы.

Анализировалась группа лекарственных веществ спазмолитического и холинолитического дей-

ствия, содержащих сложноэфирную группировку, относящихся к аммониевым солям [12,13]- соединения формулы (1): проспазмин, циклозил, бензацин, амедин, спазмолитин, арпенал, апрофен, ацефен и др. И соединения общей формулы (2): метацин, ганглерон, кватерон, пропантелин и др.



где

R = H, алкил, циклоалкил, фенил, замещенный фенил или гетарил;

R¹ = H, алкил, циклоалкил, оксигруппа, фенил, метокси-, этоксигруппа;

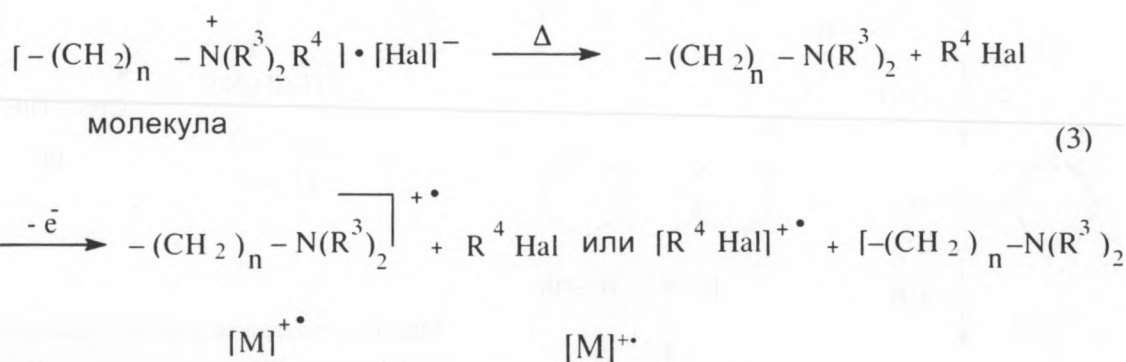
R² = H, алкил, фенил;

R³ = алкил; R⁴ = H, алкил; Hal = Cl, Br, J; n = 0 - 4; m = 0 - 2;

Y = алкелен, замещенный фенилен, дизамещенный гетарил.

Фармацевтические препараты весьма часто применяют в виде подобных органических солей для увеличения их водорастворимости. В общем случае исследуемые препараты в виде аммониевых солей (1) и (2) являются нейтральными молекулами, хотя представляют собой ионные вещества. Если молекулу из ряда исследуемых соединений рассматривать как сумму катиона (K^+) и аниона (A^-), то принятый в масс-спектрометрии термин «молекулярный ион» сохраняется и соответствует отрыву одного электрона из молекулы соли, т.е. $[M]^+ = [K^+ + A^-]^+$.

При электронном ударе аммониевые соли претерпевают термическое разложение на неионные соединения - органические соединения с ковалентной связью, которые испаряются в ионном источнике масс-спектрометра [14,15]. Термическая реакция исследуемых соединений описывается следующим уравнением (3) и происходит подобно разложению аминов по Гофману [16]:



* Сообщение об использовании в РФ для анализа смесей приборов, снабженным интерфейсом термоспрей (термоструйная распылительная ионизация) или плазмоспрей [9] до настоящего времени не поступало.

Следовательно, термоллиз исследуемых лекарственных веществ приводит к двум нейтральным молекулам, в частности, - производному третичного амина и молекуле $R^4\text{Hal}$. При ионизации первая из них полностью отражает структуру изучаемого объекта и дает псевдомолекулярный ион $[M]^+$ (молекулярная масса соединения без молекулы $R^4\text{Hal}$). Таким образом, изучаемые лекарственные соединения в масс-спектрах электронного удара будут давать псевдомолекулярный ион $[M]^+$, сохраняющий топологию строения исходного вещества. Следует отметить, что при неэквивалентных R^3 и R^4 всегда отщепляется в виде $R^4\text{Hal}$ (или $R^3\text{Hal}$) более легкая по массе молекула.

Анализ масс-спектров показывает, что ход фрагментации псевдомолекулярного иона $[M]^+$ (эквивалентно $[M - R^4Hal]^+$ или $[M - R^3Hal]^+$) определяется наличием и местонахождением в структуре молекулы карбонильной группы.

Известно, что в подобной ситуации рвутся преимущественно α -связи относительно карбонильной группировки, причем разрыв осуществляется главным образом по связи с остатком, имеющим большую молекулярную массу. Действительно, (рис. 1), ион $[a]^+$ имеет, как правило, большую интенсивность, чем ион $[b]^+$. Стабилизация иона $[a]^+$ объясняется также энергетическими факторами - заряд в ионе $[a]^+$ делокализован за счет наличия фенильного радикала (R) и заместителя R^1 (см. рис. 1).

Высокой интенсивностью обладают ионы $[V]^+$ или $[Г]^+$ при $n=1$, $[e]^+$ и $[в - Н]^+$, причем последний, как правило, максимален в масс-спектрах. Если ионы $[V]^+$ и $[e]^+$ возникают за счет простого гомолитического разрыва наиболее слабых связей (σ -связей) в молекулах исследуемых веществ (55 ккал/моль для С-Н и 75 ккал/моль для С-О по сравнению с С-С - 81 ккал/моль), то высокая интенсивность ионов $[в - Н]^+$ обусловлена энергетически выгодной перегруппировкой Мак-Лафферти (рис. 1), осуществляемой через переходное шестичленное состояние. Высокая интенсивность иона $[Д]^+$, часто максимальная в масс-спектрах исследуемых веществ (β -разрыв относительно гетероатома), связана со стабилизацией за счет образования иммониевого иона.

Совокупность ионов, наблюдаемых в масс-спектрах исследуемых веществ - $[a]^+$, $[b]^+$, $[v]^+$, $[г]^+$, $[в-Н]^+$, $[д]^+$ и $[е]^+$ хорошо характеризует их структуру и надежно контролирует все фрагменты изучаемой молекулы.

Имеются также специфические признаки фрагментации этих соединений, связанные с особенностями их строения. Например, у соединений, имеющих $R^3 = Et$, всегда наблюдается элиминирование метильной группы от иона $[M]^+$ (снова возникновение иммониевого катиона). Когда $R^3 = Me$, этот процесс не происходит.

Наличие в качестве заместителя R¹ циклоал-
кильного радикала вызывает отрыв этого радика-
ла, сопровождающийся миграцией атома водорода

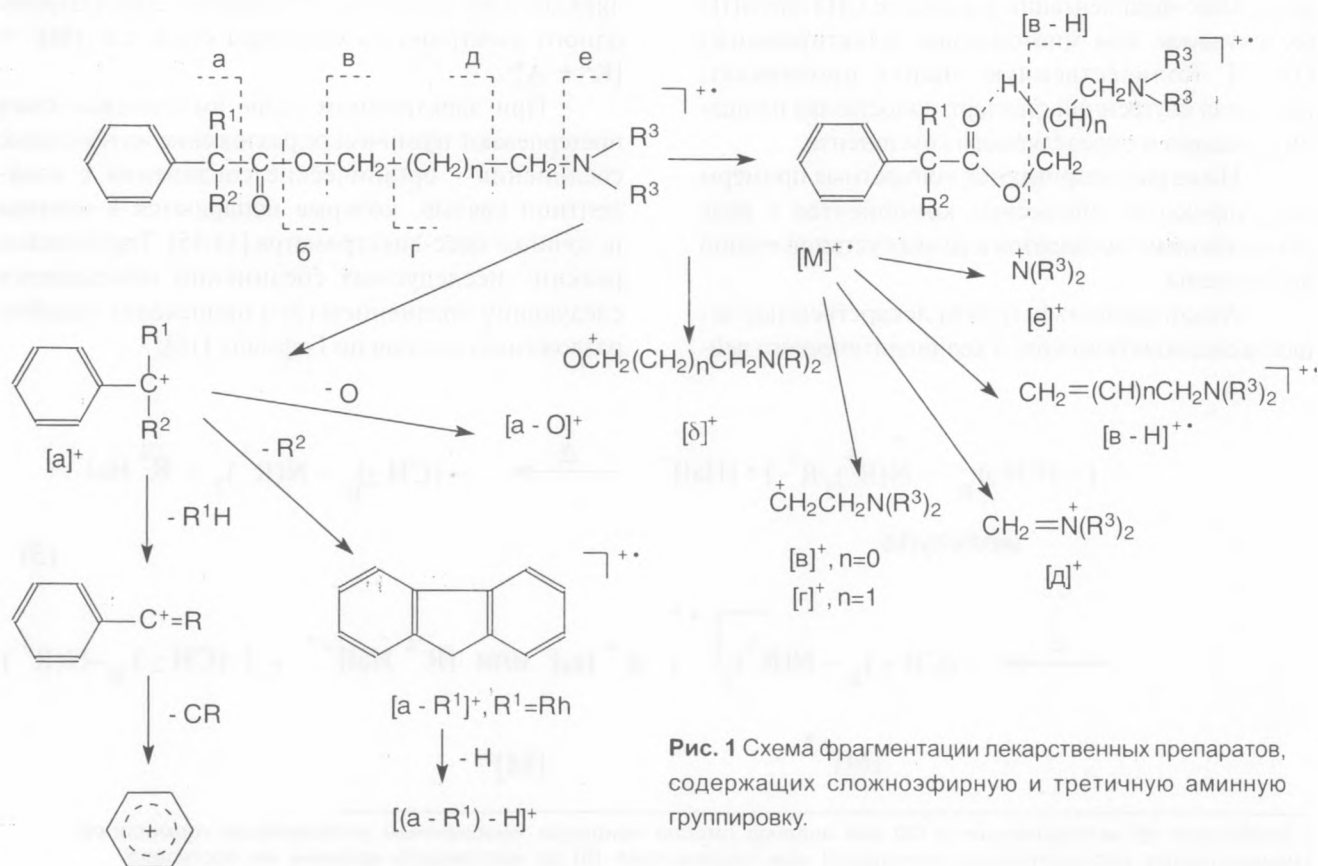


Рис. 1 Схема фрагментации лекарственных препаратов, содержащих сложноеэфирную и третичную аминную группировку.

в место разрыва связи как из иона $[M]^+$, так и из иона $[a]^+$. В случае, когда $R^1 = C_6H_5$, такого явления мы не наблюдали, зато осуществлялся процесс элиминирования радикала R^2 - ионы с m/z 166 и 165. В последнем случае идет возникновение стабильного флуорен-катиона.

Рассмотрение масс-спектров исследуемых эфиров позволяет сделать следующие выводы:

- 1) масс-спектры могут быть использованы для идентификации соединений исследуемого ряда;
- 2) специфические ионы однозначно доказывают структуру заместителей $R - R^3$;
- 3) фиксация в масс-спектрах ионов $[R^4Hal]^+$ указывает на принадлежность соединений к классу гидрохлоридов ($R^4 = H$) или соответствующих аммониевых солей.

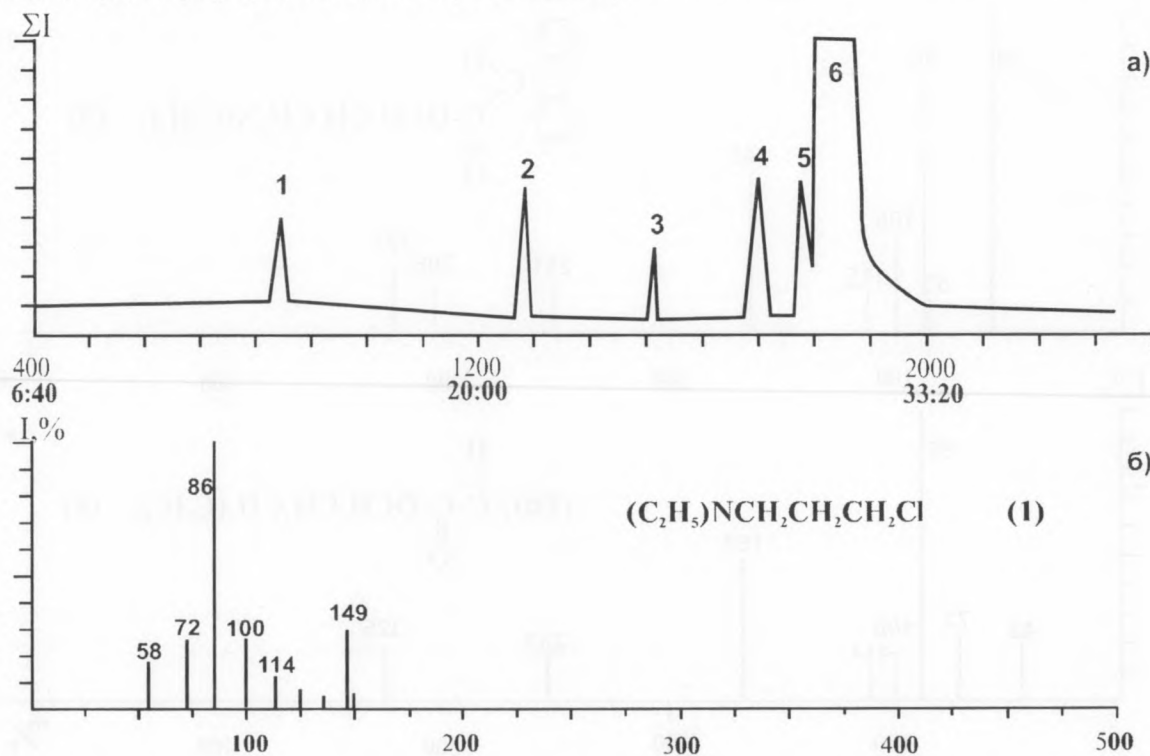
Приведенные масс-спектрометрические данные обеспечивают надежную идентификацию лекарственных веществ, содержащих в качестве основных структурных фрагментов сложноэфирную и аминную группировку.

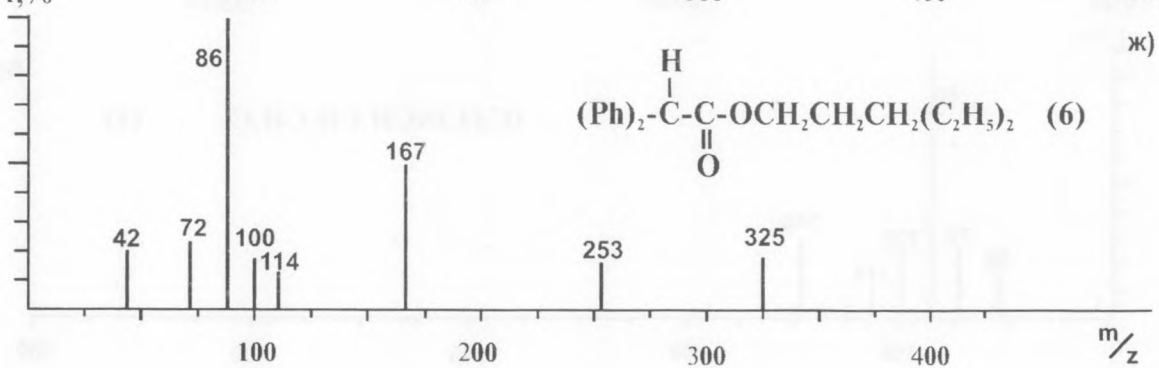
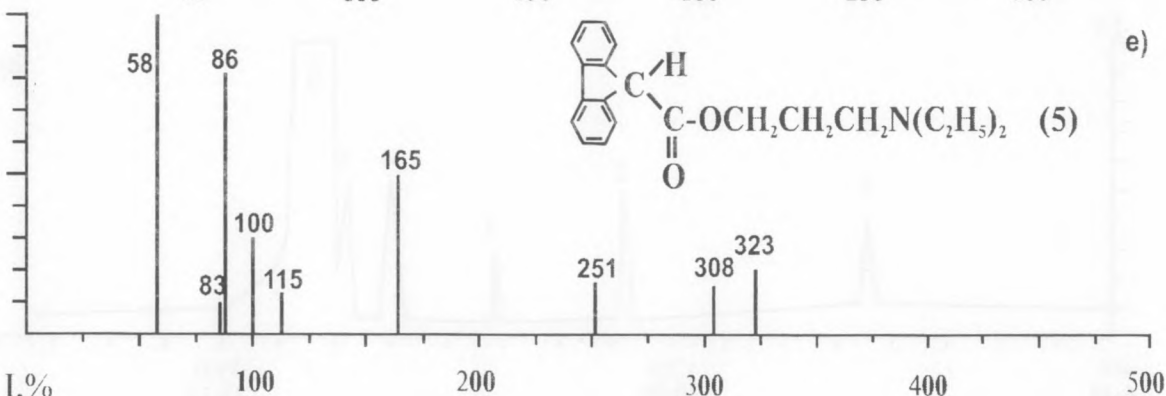
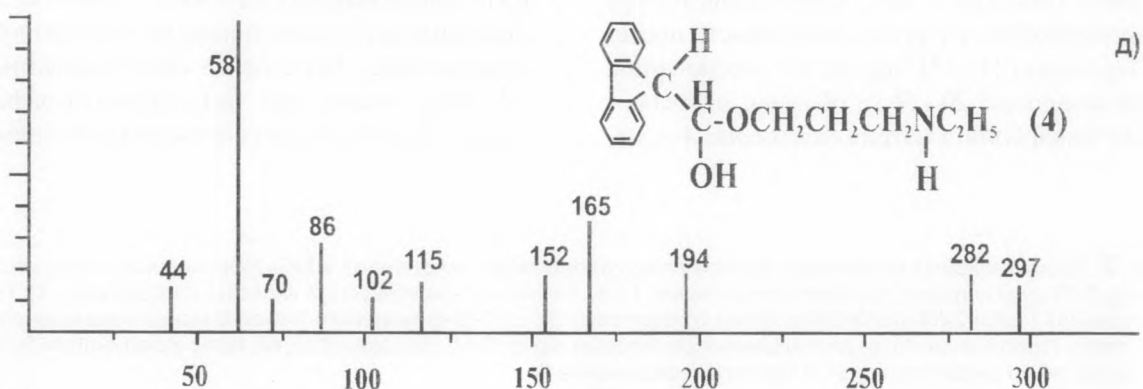
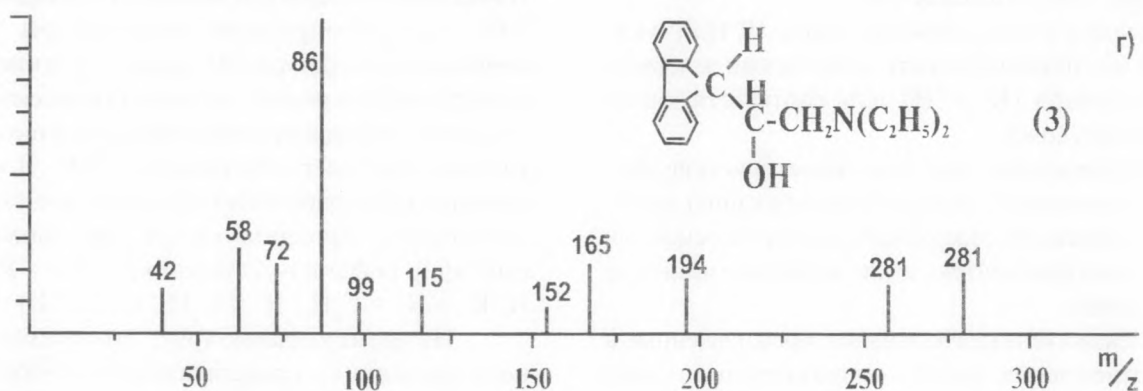
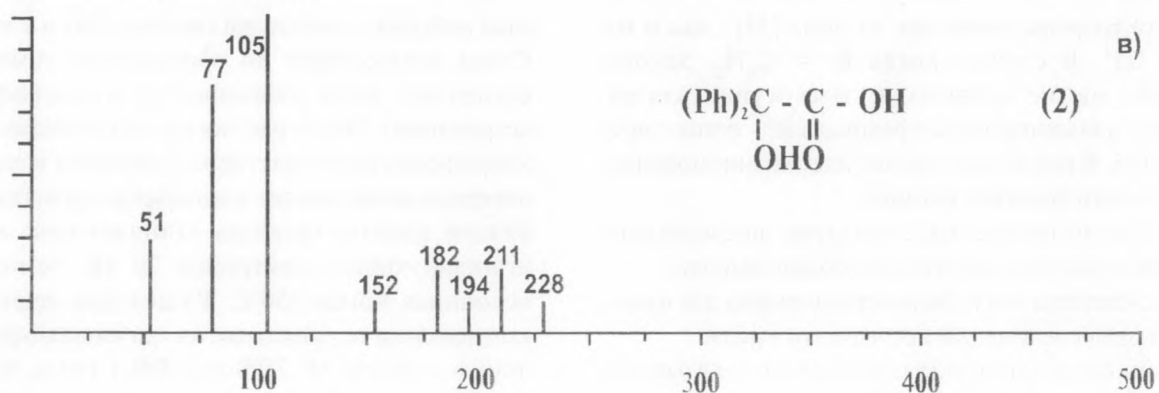
Лекарственные соединения, представленные в виде аммониевых солей - гидрохлориды, галоидометилаты (этилалаты и др.), перед проведением ХМС эксперимента, из-за неоднозначности протекания термолитиза [16,17], переводят в основания. Для этой цели берут 20 - 50 мг образца, добавляют 50-100 мг бикарбоната натрия (примерно 4-крат-

ный избыток с учетом растворимости) и 1 мл воды. Смесь встряхивают до образования гомогенной суспензии, затем добавляют 0,5 мл хлороформа и встряхивают. После расслоения фаз отбирают 1 мкл хлороформенного раствора (нижнего) и после его лиофилизации вводят в инжектор хроматографа. Режим работы прибора стандартный: энергия ионизирующих электронов 70 эВ, температура источника ионов 250°C. Разделение вещества на компоненты осуществляется на капиллярных колонках с фазой SP-2100 или DB-1 (60 м, 0,25 мм). Начальная температура термостата хроматографа - 50°C, программирование температуры 5°/мин, конечная температура 250°, далее в течение 15 мин изотермический режим; скорость газа-носителя (He) 1 мл/мин; температура инжектора и интер-фейса - хроматограф-масс-спектрометр - 250°. В качестве примера структурной идентификации рассмотрены компоненты «Арпенала» (диэтиламинопропионовый эфир дифенил-уксусной кислоты - $R = R^4 = H$, $R^1 = R^2 = C_6H_5$, $R^3 = C_2H_5$, $n = 3$, $Hal = Cl$ (1).

На хроматограмме (рис. 2а) помимо основного продукта 6, представляющего собой «Арпенал» (время выхода с колонки: $t_{мин} = 30'54''$), что подтверждается идентичностью полученного масс-спектра (рис. 2б) с ранее опубликованным МС-ЭУ [12], видим еще пять хроматографических пиков, принадлежащих примесным компонентам.

Рис. 2. Хроматограмма по полному ионному току (а) препарата «Арпенал» и МС-ЭУ основных компонентов: б) 1-хлор-3-(N-диэтиламино)пропана (соединение 1); в) дифенил-(1-оксиуксусной кислоты (соединение 2); г) 1-(9-флуоренил)-1-окси-2-(N-диэтиламино)этан (соединение 3); д) 1-(9-флуоренил)-1-окси-3-моноэтиламинопропиловый эфир (соединение 4); е) диэтиламинопропиловый эфир (9-Н) флуореновой кислоты (соединение 5); ж) диэтиловый эфир дифенилуксусной кислоты (соединение 6).

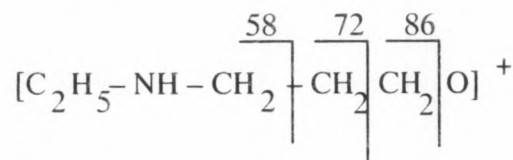




Соединение 1 имеет пик $[M]^+$ с m/z 149:151 и соотношение пиковых интенсивностей 3:1, что свидетельствует о присутствии одного атома хлора в составе молекулы. Остальные пики ионов в МС-ЭУ (рис. 2б) не представлены в виде дублетов, что исключает содержание хлора в них. Максимальной интенсивностью обладает пик иона с m/z 86, что относится к стабильному фрагменту иммониевой структуры $[(C_6H_5)_2N=CH_2]^+$ (ион $[d]^+$ на рис. 1). Последнее подтверждено данными масс-спектрометрии высокого разрешения (МСВР) - определено: 86,0963. Таким образом, к неизвестной в структурном отношении относится часть спектра в диапазоне от m/z 114 - $[M-Cl]$ до m/z 86. В этом промежутке виден один пик иона с m/z 100. Наблюдаемое различие в 14 а.е.м. можно отнести к метиленовой цепочке. Совокупность полученных данных убеждает нас в том, что примесный ком-понент 1 имеет структуру 1-хлор-3-(N-диэтиламино)пропана ($t_{мин} = 14'22''$, выход 0,43%). В МС-ЭУ **соединения 2** (рис. 2в) виден пик $[M]^+$ с m/z 228. Наличие иона с m/z 77 (групповая характеристика) свидетельствует о принадлежности соединения к замещенным арилам. Характерного иона с m/z 91, имеющего тропилиевую структуру в масс-спектре не видно. Этот факт дает основание считать, что наблюдаемый пик иона с m/z 105 содержит атом кислорода (типа $C_5H_5-(C=O)-$ или $C_6H_5-C(-OH)$) (рис. 2г). Распад $[M]^+$ связан с последовательным элиминированием частиц OH^- иона с m/z 211 и 194, что предполагает присутствие еще одной группы OH среди заместителей R или R'. Важным в структурном отношении является пик иона с m/z 152, обычно имеющий структуру бифенилена. Низкая интенсивность этого иона характерна для соединений, имеющих фрагмент $(C_6H_5)_2-C(-OH)$. Ион с m/z 182 отвечает формуле $(C_6H_5)_2C(OH)$. Поэтому можно считать, что структура соединения 2 описывается следующей формулой - α -оксифенилуксусной кислоты. Появление иона с m/z 194 в МС-ЭУ связано с возникновением структуры кетена - $[C_6H_5)_2C=C=O]^+$. Соединение 2 имеет $t_{мин} = 21'11''$ и содержится в арпенале в количестве 0,93%. Для **соединения 3** ($t_{мин} = 24'43''$, содержание 0,56%) регистрируется пик $[M]^+$ с m/z 281. Нечетная масса $[M]^+$ и фиксирование максимального по интенсивности пика иона с m/z 86 убеждает нас в наличии иммониевого фрагмента структуры $CH_2=N(C_2H_5)_2$. Регистрация ионов с m/z 152, 165 и 194 предполагает образование 9-замещенного флуоренового катиона. Обобщая полученные данные, можно приписать соединению 3 (рис. 2г) структуру 1-(9-флуоренил)-1-окси-2-(N-диэтиламино)этана.

Соединение 4 имеет следующий масс-спектр (см. рис. 2д), в котором виден пик $[M]^+$ с m/z 297 ($t_{мин} = 28'27''$, содержание 8,35%). Регистрация ионов с m/z 152, 165 и 194 предполагает, что ион флуореновой структуры сохраняется. Высокая интенсив-

ность иона с m/z 58 структуры иммониевого катиона - $[CH_2=NHC_2H_5]^+$ ($[d]^+$) и фиксация ионов с m/z 72 и 86 предполагает образование ионов типа $[g]^+$ и $[v]^+$ (рис. 1). Для иона типа $[d]^+$ отдельно измерено точное массовое число (определено 58,0654; расчет для C_3H_8N - 58,0657). Дополнительно виден ион с m/z 102. Таким образом, аминная цепочка в данном соединении представлена в виде:



Сумма приведенных данных позволяет приписать **соединению 4** структуру 1-(9-флуоренил)-1-окси-3-этиламино-пропилового эфира. В масс-спектре **соединения 5** фиксируется пик $[M]^+$ с m/z 323, что на 2 а.е.м. меньше массы целевого продукта 6 (рис. 2е). По-видимому, соединение 5 ($t_{мин} = 30'02''$, выход 4,32%) может отличаться от продукта 6 либо возникновением π -связи в алифатических остатках, либо циклизацией фенильных ядер и образованием флуорена. Регистрация ионов с m/z 58, 72, 86, 100 и 115 (атом водорода мигрирует из положения 9 флуоренового остатка) исключает наличие π -связи в алкиламинном фрагменте молекулы. Возможность же циклизации фенильных ядер подтверждено фиксацией иона с m/z 165. Из нашего рассуждения вытекает, что примесь 5 имеет структуру диэтиламинопропилового эфира (9-Н) флуореновой кислоты. По нашему мнению, результаты компонентного состава препарата «Арпенал» следует учитывать при пересмотре нормативной документации на препарат (чистота $\geq 95\%$), т.к. сумма примесей составляет 14,59%.

Использование комбинации ВЭЖХ-МС для соединений формулы (1) и (2) связано с тем преимуществом, что исследуемый препарат препаративно разделяют непосредственно в виде аммониевой соли. Однако, трудности, связанные с накоплением конкретной примеси (особенно присутствующей в малом количестве), несоизмеримы с методом ХМС. При исследовании компонентного состава детектирование происходит неоднозначно (углеводороды, алкиламины и другие возможные примеси не фиксируются УФ-детектором). В дальнейшем, при съемке МС-ЭУ выделенных примесей необходимо учитывать хроматографический фон (смесь элюентов). От фона освобождают с помощью его вычитания (МС-ЭУ фона) из МС-ЭУ примеси (операция осуществляется через ЭВМ).

С помощью комбинации методов ВЭЖХ и МС был исследован препарат - кватерон (иодэтилат 3-диэтиламино-1,2-диметилпропиловый эфир паран.бутоксibenзойной кислоты) $R^1 = CH_3$; $R^3 = R^4 = C_2H_5$; $n = 2$; $m = 1$; $Hal = J$; $Y = CH_3(CH_2)_3O-n-C_6H_4$

- согласно формуле (2) [18, 19]. Хроматограмма кватерона приведена на рис. 3. Наблюдаемая идентичность хроматограмм, полученных при детектировании на обеих длинах волн - (макс 220 и 260 нм, свидетельствует о том, что все примесные продукты в кватероне содержат в структуре арильный фрагмент (рис. 3).

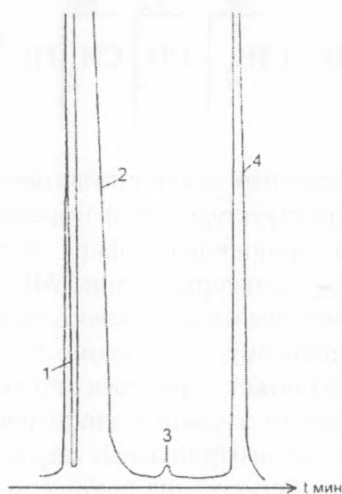


Рис. 3.
Хроматограмма
препарата
«Кватерона».

Хроматографирование, количественная оценка и выделение примесных компонентов в фармацевтическом препарате кватероне проведены на жидкостном хроматографе «Jilson» (Франция). В качестве колонки использовался пластиковый патрон с радиальным сжатием (100 x 8 мм), заполненный обращеннофазовым сорбентом «Nowa Pak C-18» с размером частиц 5 мкм. Состав подвижной фазы: 150 мл (0.01 M) аммиачно-фосфатного буфера (pH 7.5): 200 мл метанола: 150 мл ацетонитрила. Объем пробы, вводимой в хроматограф, 100 мкл.

В МС-ЭУ компонента 1 регистрируется пик $[M]^+$ с m/z 166. Четная масса иона указывает на отсутствие атома азота в составе этого соединения. Элиминирование частиц $OSCH_3$ и CH_3OCO из $[M]^+$ и наличие иона $[CH_3OCO]^+$ свидетельствует о присутствии метилэфирной группировки в составе молекулы при сохранении фенильного ядра - ионы с m/z 92, 77, 65, 63 и 51. Наблюдаемый отрыв метильной группы у производных бензола обычно связывают с β -распадом простой связи относительно ароматического ядра (ион с m/z 151). Указанных данных достаточно, чтобы приписать компоненту 1 структуру метилового эфира пара-метоксибензойной кислоты ($t_{мин} = 0,88$; выход = 1,8%). Указанный характер фрагментации близок к исследованному механизму распада метилового эфира паратолуиловой кислоты. В таком случае можно считать, что образование этой примеси (компонент 1) связано с кислотными свойствами фенола, поэтому при

образовании метильного эфира пара-бензойной кислоты происходит частичное метилирование оксигруппы.

Полученный масс-спектр компонента 2 ($t_{мин} = 2,07$; выход 88,2%) идентичен МС-ЭУ кватерона, приведенному в работе [13]. В МС-ЭУ компонента 3 ($t_{мин} = 8,51$; выход 0,2%) фиксируется пик $[M]^+$ с m/z 370. Регистрация осколочных ионов с m/z 178, 177, 149, 134, 120, 92, 91, 77 и 57 свидетельствует о том, что фрагмент п-бутоксibenзойной кислоты - ион $[a+CO]^+$ (рис. 1) остался неизменным в структуре данной примеси. По данным МСВР пику иона с m/z 193 соответствует брутто-состав $C_{11}H_{13}O_3$ (определено: 193,0868; расчет 193,0864). Отсутствие дополнительных пиков ионов в МС-ЭУ компонента 3 (кроме m/z 313 - $[M - C_4H_9]^+$) указывает на образование ангидрида н.бутоксibenзойной кислоты. Можно предполагать, что возникновение данной примеси происходит при получении пара-бутоксibenзойной кислоты (или ее натриевой соли) на одной из промежуточных стадий синтеза препарата кватерона при наличии хлорангидрида пара-бутоксibenзойной кислоты в реакционной среде.

Для компонента 4 в МС-ЭУ зарегистрирована молекулярная масса, равная 335 а.е.м. ($t_{мин} = 13,91$; выход 9,8%). Присутствие в спектре иона с m/z 156 позволяет отнести данную примесь к аммониевым солям, у которых в качестве противоиона выступает йод (йодэтилат). Нечетная молекулярная масса компонента 4 показывает наличие одного атома азота в составе молекулы («азотное правило»). Несовпадение с молекулярной массой компонента 2 и фиксация ионов - $[M-e]^+$, $[a+CO]^+$, $[M-v]^+$, $[v]^+$, $[r]^+$, и $[d]^+$ (рис. 1) показывает, что примесь 4 является изомером компонента 2. Основные отличия связаны с регистрацией иона $[M-CH_2CH_2N(C_2H_5)_2]^+$ и изменением массового числа у иона $[r]^+$. Эти факты позволяют считать, что изменения в структуре произошли за счет изомеризации углеводородной цепи в алкиламинной части молекулы, и выделенный компонент 4 имеет структуру - йодэтилата 3-диэтиламино-1-этилпропилового эфира пара-н.бутоксibenзойной кислоты. Можно предположить, что возникновение изомера 4 происходит при взаимодействии метилэтилкетона с диэтиламино, когда в реакции частично участвует и α -водородный атом метильной группы.

Аналогичный подход был продемонстрирован при интерпретации примесных компонентов в исходных, промежуточных и конечных продуктах синтеза фармацевтического препарата бромизовала - N- α -(бромизовалерианил)мочевины [20], используемого в качестве успокаивающего и снотворного лекарства.

Иной подход к интерпретации примесных компонентов необходим при анализе изомерных

терпеноидов в эфирных маслах (ЭФ), применяемых в медицинской промышленности (ЭФ мяты, шалфея, укропа, камфоры и др.). Разработанная методика идентификации [21,22] исключала обязательное применение эталонов в изомерно-специфическом анализе групп изомеров (терпены и их спирты, кетоны, кислоты, эфиры, сесквитерпены и др.) в качестве веществ-свидетелей. В ее основе лежат библиотечные масс-спектрометрические и хроматографические данные. На сегодняшний день известны МС-ЭУ более 450 соединений, относящихся к классу терпеноидов, и около 350 соединений сесквитерпенового ряда, включая МС-ЭУ дубликатов. Современные подходы к идентификации компонентного состава ЭФ изложены в обзорах [23-25]. Правомерность использования библиотечных данных доказывалась хорошей воспроизводимостью МС-ЭУ терпеноидов, полученных на различных приборах ($r \geq 96\%$). В качестве основного критерия идентификации используют сравнение МС-ЭУ для исследованного компонента и библиотечного спектра. Предложено для сравнения брать отношения интенсивностей сигналов 3-5 специфических ионов для определенного класса (групповая характеристика класса). Например, для монотерпеновых углеводородов ионы с m/z 121, 93, 92, 91 и т.д.; для монотерпеновых спиртов - иона с m/z 138, 123, 96, 95, 94 и т.д.; для сесквитерпенов - ионы с m/z 204, 161, 119, 105 и т.д. (табл. 1). Соотношение интенсивностей увеличивает селективность и правильность интерпретации среди изомеров, т.к. этот критерий наиболее защищен от влияния экспериментальных факторов (сред. относительная ошибка составляет 4%) [26]. Идентификация компонентов ЭФ проводится путем последовательного введения аналитических фильтров масс-спектрометрического (см. табл. 1) для данного класса соединений с включением дополнительных индивидуальных показателей (например, специфический пик иона для конкретного соединения) и хроматографического (по индексам Ковача [20, 22, 25, 27, 28]). Идентификация считается однозначной, если значения соотношений интенсивностей пиков ионов и индексы Ковача (воспроизводимость 2 ед.) не превышают ошибок эксперимента и воспроизводимости.

Проиллюстрируем применение разработанной методики в анализе минорных примесей в синтетической камфоре (1,7,7-триметил-бицикло[2,2,1]гептан-2-оне) [29], используемой для инъекций (кардиотоническое, аналептическое и антисептическое средство). При расшифровке хроматографических пиков использовали двойной контроль. Осуществляли идентификацию ЭФ с помощью МС-ЭУ, снимая масс-спектр на максимуме хроматографического пика и беря отношения интенсивностей пиков ионов для определенных классов терпеноидов, и хроматографический по индексам

Ковача. В синтетической рацемической камфоре обнаружены следующие компоненты - названия (содержание в %): монотерпеновые углеводороды - α -пинен (0,12), камфен (0,22), камфан (0,01), экзо-изокамфан (0,30), α -фенхен (0,11), экзо-камфен (0,01), трициклен (0,22); монотерпеновые спирты - эндо-борнеол (0,36), экзо-изоборнеол (0,26), эндо-фенхол (0,01), 5-экзо-изокамфан-3-ол (0,01); монотерпеновые кетоны - камфора (97,33), фенхон (0,13), изофенхон (0,07), 5-экзо-изокамфан-3-он (0,61); монотерпеновые эфиры - 1,8-эндо-борнилацетат (0,12), экзо-изоборнилацетат (0,10). По сравнению с натуральной японской камфорой число монотерпеновых углеводородов в синтетической камфоре примерно в 2 раза больше, зато монотерпеновых спиртов в 2 раза меньше. Число монотерпеновых эфиров в синтетической камфоре примерно в 3 раза выше, чем в натуральной. Натуральная камфора не содержит кетонов.

По аналогичным признакам проводилась интерпретация продуктов деградации изомерных изофитолов (производные витамина E) [30], продуктов фитопревращения провитамина D₄ [31,32].

При микробиологическом синтезе антибиотиков, который осуществляется на сложных питательных средах в условиях интенсивной аэрации и механического перемешивания, возникает обильное пенообразование, мешающее нормальному проведению технологического процесса. Пеногашение в ферментативных процессах осуществляют добавлением синтетических поверхностно-активных веществ (ПАВ), производимых на предприятиях Минхимпрома и за рубежом [33]. Остаточные количества синтетических пеногасителей (ПГ) в антибиотиках могут привести к снижению качества препарата, т.к. известно, что ПГ пропинол Б-400 может быть заменен на более эффективный ниоген П-1000 или менее токсичный для продуцентов антибиотиков лапрол-2102. Применение ПАВ исключает использование дорогостоящих продуктов - кашалотового жира, пальмового масла и других ПГ в производстве антибиотиков.

Используемые синтетические ПАВ являются, как правило, полимерными веществами, для которых обычное сочетание методов ГЖХ или ВЭЖХ с масс-спектрометрией неприемлемо. Для определения следовых количеств ПГ в опытных образцах антибиотиков (табл. 2) использовался метод масс-спектрометрии, обеспечивающий среднюю чувствительность обнаружения на уровне $1 \cdot 10^{-5}\%$. Методика качественного определения ПГ, химически не связанного с антибиотиком, включает два основных этапа: 1) выбор характеристических пиков ионов, специфичных для используемого ПГ, не накладывающихся на пики ионов в масс-спектре исследуемого антибиотика и 2) съемка масс-спектра исследуемого образца антибиотика в широком диа-

Таблица 1

Сравнение МС-ЭУ монотерпеновых углеводов (изомеров)
по отношению интенсивностей пиков ионов

№ п/п	Название	J_{92}/J_{121}	J_{121}/J_{91}	Количество неотличимых МС-ЭУ	J_{92}/J_{93}	J_{80}/J_{92}
1	7-изопропилиденби- цикло[4,1,0]гептан	0,20	1,79	-	-	-
2	Спиро[4,5]децен-1	0,25	0,63	-	-	-
3	β -Фелландрен	0,31	0,32	-	-	-
4	β -Терпинен	0,31	0,41	-	-	-
5	4-(10)-Карен	0,35	0,14	-	-	-
6	Сабинен	0,36	0,24	-	-	-
7	4-Карен	0,43	1,66	-	-	-
8	7,7-Диметил-3-метилен- бицикло[3,1,1]гептан	0,45	0,33	-	-	-
9	Транс-м-Мента-4,8-диен	0,50	2,38	1	-	0,17
10	β -Пинен	0,53	0,71	2	0,75	0,09
11	Борнилен	0,54	0,62	2	-	-
12	Камфен	0,55	2,93	1	0,79	-
13	Мета-мента-1(7),8-диен	0,60	2,93	1	-	-
14	α -Фенхен	0,60	1,62	1	-	-
15	Цис-м-мента-4,8-диен	0,65	0,92	2	0,99	-
16	Мирцен	0,67	0,46	-	-	-
17	α -Фелландрен	0,74	0,10	1	0,18	-
18	3-Карен	0,84	0,67	1	0,33	-
19	α -Туйен	0,87	0,11	1	0,08	-
20	γ -Терпинен	0,88	1,09	-	-	-
21	Транс-2-карен	0,97	0,50	2	1,94	0,17
22	β -Оцимен-х	1,00	0,58	4	0,03	0,70
23	β -Оцимен-у	1,00	0,72	2	0,14	0,47
24	Цис-2-карен	1,01	0,69	2	1,46	0,15
25	Трициклен	1,04	1,45	2	0,72	0,19
26	α -Пинен	1,11	0,43	2	2,58	0,08
27	β -Туйен	1,17	1,52	1	0,50	0,30
28	Циклофенхен	1,35	1,13	1	1,20	-
29	3,7,7-Триметилбицик- ло[3,1,1]-гептен-2	1,42	0,33	1	4,30	-
30	м-Мента-1(6)-8-диен	3,80	0,88	-	-	-

пазоне температур испарения пробы (от 30 до 300°C) в ионном источнике прибора при непрерывном сканировании в условиях селективного (по 6-8-ми характеристическим пикам ПГ) детектирования ионных токов, так называемый способ «масс-фрагментографии» [10,34]. Съемка МС-ЭУ осуществляется в условиях программированного роста температуры испарения пробы антибиотика со скоростью 5°/сек. Условия эксперимента стандартные [12].

Пенотгаситель считается обнаруженным при условии симбатного увеличения интенсивностей всех

характеристических ионов определяемого ПГ. В этом случае должны сохраняться постоянными соотношения интенсивностей характеристических ионов ПГ (в пределах 15% относит.) при соотношении сигнал:шум прибора = 10:1.

Количественная оценка ПГ производится путем сравнения площади отдельного характеристического иона с площадью того же иона в стандартном образце. Детектирование ионных токов у стандартов (0,1-0,00001% растворы анализируемого ПГ) производят в тех же условиях, что и съемка

Таблица 2

Масс-спектрометрические характеристики используемых пеногасителей

Марки пеногасителей	Антибиотики	Характеристические пики ионов пеногасителей – m/z ($J/J_{\text{макс}}$)
Пропинол Б-400 Пропинол Б-1000	Na- и K-соль бензилпенициллина. Хлоргидрат тетрациклина. Стрептомицин сульфат	59(100), 99(95), 117(99), 157(24), 175(56), 233(20)
Контрамин 210	Эритромицин. Хлоргидрат окситетрациклина	115(100), 129(81), 228(41), 25(63), 264(28), 282(33), 284(30)
Силикон SAF-471	K-соль бензидпенициллина	341(34), 349(22), 355(77), 369(76), 429(41), 503(20)
Полисилоксановый ПМС-154А	K-соль бензилпенициллина. Гентамицин сульфат	147(74), 221(23), 281(20), 402(24), 475(27), 564(22)
Пропиленгликоль 2000 (Лапрол 2102)	Хлоргидрат линкомицина и окситетрациклина. K-соль бензилпенициллина. Сизомицин сульфат	155(93), 184(51), 198(61), 205(96), 212(55), 220(60), 226(44), 240(233)

масс-спектров образцов антибиотиков.

Аналогичный методический подход можно распространить, определяя масс-спектрометрическим путем остаточные количества термолабильных, малолетучих и токсичных примесей в антибиотиках, например, токсичный госсипол в бензилпенициллине; фенилгидразин в Д-пеницилламине; остаточные мономеры в гентамицине, а также флокулянты, липиды и др.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Описаны принципиальные подходы к интерпретации и установлению строения примесных минорных компонентов в фармацевтических препаратах. Арсенал приемов для поставленной задачи может быть значительно шире, и их выбор должен быть продиктован конкретной аналитической проблемой. В рамках данного сообщения невозможно привести и разобрать примеры, где необходимые требования к масс-спектрометрическому анализу включают различные виды ионизации (химической – отрицательные и положительные ионы, полевой десорбции, бомбардировки быстрыми атомами) и хроматографического разделения и выделения примесей на следовом уровне (до $1 \cdot 10^{-12}$ г/г – например, анализ диоксина в различных природных матрицах).

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственная фармакопея СССР. 11 издание./ Бобков Ю.Г., Бабаян Э.А., Машковский М.Д. и др. - М.: Медицина, 1987. - 336 с.
2. Чепмен Дж. Практическая органическая масс-спектрометрия: Пер. с англ. - М: Мир, 1988. - 216 с.
3. Burlingame A.L., Castagnoli N. (Ed) Mass Spectrometry in the Health and Life sciences. - JR: AMSTERDAM-OXFORD-N.Y.-TOKYO: Elsevier, 1985. - V.24. - 638 с.
4. Waller G.R., Dermer O.C. (Ed) Biochemical Applications of Mass Spectrometry - N.Y.-LONDON-SYDNEY-TORONTO: Wiley-Interscience, 1980. - 1279 с.
5. Ключев Н.А. Анализ суперэкоотоксикантов и источники их обнаружения // ЖАХ. 1996. Т.51. № 2. с.163-172.
6. Rosen J.D. (Ed) Application of New Mass Spectrometry Techniques in Pesticide Chemistry/-N.Y.-CHICHESTER-BRISBANE-TORONTO-SINGAPORE: Wiley-Interscience, 1987. - 264 P.
7. Ключев Н.А. Теоретические аспекты исследования прототропной таутомерии методом масс-спектрометрии //Извест. СХНЦ ВШ, сер. естеств. наук.-Р-Д.: - 1989, № 3. - (рег. 56).
8. Заикин В.Г., Микая А.И. Химические методы в масс-спектрометрии органических соединений. - М.: Наука, 1987. - 200 с.
9. Поляков А.А., Ревельский И.А., Токарев М.И. Масс-спектральный анализ смесей с применением ионно-молекулярных реакций. - М.: Химия, 1989. - 240 с.
10. Анисимова О.С., Линберг Л.Ф., Шейнкер Ю.Н.

Масс-спектрометрия в исследовании метаболизма лекарственных препаратов. - М.: Медицина, 1978. - 168 с.

11. Niessen W.M.A A review of direct liqued intriduction interaction for LC/MS // *Chromatographia*. - 1986. - V.21.-n.6.-p.342-354.

12. Адеишвили Л.В., Ключев Н.А., Арзамасцев А.П. Масс-спектрометрическое исследование лекарственных веществ, содержащих сложноэфирную и аминную группировку // *Хим.-фарм. журн.* - 1988. - Т.22, №12. - с.1500-1503.

13. Адеишвили Л.В., Ключев Н.А., Жильников В.Г. Масс-спектрометрическое изучение аммониевых солей некоторых фармацевтических препаратов // *Хим.-фарм. журн.* - 1989. - Т.23, №2. - с.230-235

14. Адеишвили Л.В., Ключев Н.А., Арзамасцев А.П. Применение масс-спектрометрии в контроле лекарственных веществ, содержащих простую эфирную связь и третичную аминную группу // *Фармация*, 1989. - Т.38, № 1. - с.46-48.

15. Адеишвили Л.В., Ключев Н.А., Коротков М.Г. Идентификация примесей в генглероне методами ВЭЖХ и масс-спектрометрии // *Хим. фарм. журн.* - 1989. - Т.23, № 4. - с.492-495.

16. Velth H.J. Mass Spectrometry of ammonium and iminium salts // *Mass spectrom. Rev.* - 1983. - V.2. - p.419-446.

17. Терентьев П.Б., Станкявичюс Ф.П. Масс-спектрометрический анализ биологически активных азотистых оснований. - Вильнюс.: Мокслас, 1987. - 279 с.

18. Адеишвили Л.В. Использование комплекса физико-химических методов для стандартизации и контроля качества лекарственных средств, содержащих эфиры арилалифатического и ароматического ряда. Диссерт. Д-ра фарм. наук. - М., 1990. - 380 с.

19. Адеишвили Л.В., Ключев Н.А., Коротков М.Г. Идентификация примесей в фармацевтическом препарате кватероне // *Фармация*, 1990. - Т.39, № 1. - С.

20. Евтушенко Н.С., Ключев Н.А. Хромато-масс-спектрометрическое исследование качества исходных промежуточных и конечных продуктов синтеза N-[α -бромизо-валерианил]мочевины // *Хим.-фарм. журн.* - 1986. - Т.20, № 8. - с.1004-1009.

21. Замуреенко В.А., Ключев Н.А., Дмитриев Л.Б., Грандберг И.И. Хромато-масс-спектрометрический метод идентификации компонентов фирных масел (на примере *Pelargonium roseum*). // *Извест. ТСХА*. - 1979. - вып.1. - с.156-162.

22. Zamureenko V.A., Klyuev N.A., Dmitriev L.B., Grandberg I.I. Gas-liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of essential oils // *J. Chromatogr.* - 1984. - V.303. - p.109-115.

23. Ключев Н.А., Змуреенко В.А., Евтушенко Н.С. Применение физико-химических методов в анализе

эфирных масел. // *Фармация*, 1986. - Т.35, № 1. - с.76-83.

24. Ключев Н.А., Замуреенко В.А., Евтушенко Н.С. Использование масс-спектрометрии в структурном анализе компонентов эфирных масел. // *Фармация*, 1986. - Т.35, № 6. - с.69-76.

25. Ключев Н.А., Замуреенко В.А., Евтушенко Н.С. Применение ХМС для определения компонентного состава эфирных масел. // *Фармация*, 1987. - Т.36, № 5. - с.70-77.

26. Ключев Н.А. Шейнкман А.К., Жильников В.Г. Новый метод сравнительной оценки и прогнозирования активности антиоксидантов с помощью масс-спектрометрии. // *Докл. АН СССР*. - 1977. - Т.232, № 3. - с.618-621.

27. The Sadlter standard gas chromatography retention index library. -USA: Philadelphia, - V.4. - 757 P.

28. Davies N.W. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and carbowax 20 Mpha // *J.Chromatogr.*, V. 503. - с. 1-24.

29. Ключев Н.А., Евтушенко Н.С., Замуреенко В.А. Исследование качества синтетической рацемической камфоры методом ХМС. // *Фармация*, 1988. - Т.37, № 4. - с.32-36.

30. Тарабрин М.Б., Ключев Н.А., Евстигнеева Р.П., Есипов С.Е., Булычев Э.Ю. ХМС изучение строения продуктов деградации изофитола. // *Хим.-фарм. журн.* - 1985. - Т.19, - 10. - с.1241-1246.

31. Андреев А.В., Ехвалова Т.В., Ключев Н.А., Михайлова Н.П., Вьюнов К.А. Продукты фотопревращения провитамина Д4, полученного из мутантных дрожжей. I. Облучение в этаноле. // *Химия природ. соед.* - 1989. - №2. - с.247-254.

32. Андреев А.В., Ухвалова Т.В., Ключев Н.А., Михайлова Н.П., Вьюнов К.А. Продукты фотопревращения провитамина Д4, полученного из мутантных дрожжей. II. Облучение в гептане. // *Химия природ. соед.* - 1989. - №3. - с.298-403.

33. Иванкова Т.А., Ковалев В.Н., Лебедев Л.Н., Макаревич В.Г., Кибальник В.С. Сравнение синтетических пеногасителей, применяемых при биосинтезе антибиотиков. // *Хим.-фарм.журн.* - 1982. - Т.16, № 2. - с.206-209.

34. Ключев Н.А., Жильников В.Г., Есипов С.Е., Иванкова Т.А. Использование метода селективного детектирования ионных токов в масс-спектрометрии для определения микропримесей в различных образцах антибиотиков. // Всесоюз.конф. «Основные направления исследований по обеспечению качества антибиотиков и полупродуктов для их производства». (Москва, ноябрь 1986 г.): Тез. Докл. - Москва: Минмедпром, 1986. - с.107-108.